

TI Liposomes prepared from amino group-containing phospholipids and their surface modification for use as stable drug delivery system

IN Myazaki, Takeshi; Suginaka, Akinori; Kadoma, Yoshihito

PA Nippon Oils & Fats Co Ltd, Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 12 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

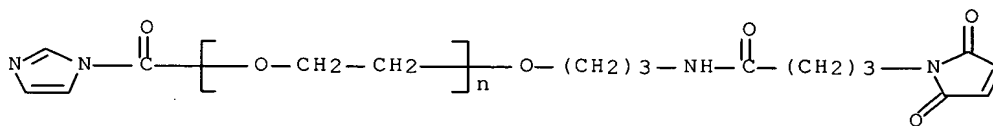
LA Japanese

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 08117586	A2	19960514	JP 1994-264221	19941027
PRAI	JP 1994-264221		19941027		

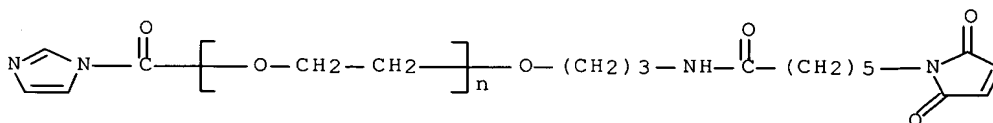
AB Liposomes having on the surface the reactive groups-  
contg. (poly)oxyalkylene (1-maleimidyl)-X-(OA)n-O-(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>)-CO-NH-Lip  
(I; OA=C<sub>2</sub>-4-oxyalkylene; n=1-1000; oxyalkylenes need not be same when  
n>2; oxyalkylene may be random or block; X=divalent org. group; p=1-6;  
q=0,1; Lip-NH = NH<sub>3</sub> contg. phospholipid component of liposome) are  
prepd. By reacting the liposomes prepd. from NH<sub>3</sub>-contg. phospholipids  
with (1-maleimidyl)-X-(OA)n-O-(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>)-CO-NH-B (II; OA, n, X, p, q, as  
in I; B= amino-reactive group). Prep. of polyoxyalkylene deriv.  
(1-maleimidyl)-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)n-O-CO-(1-imidazolyl) (III)  
by reacting .alpha.-OH-.omega.-propylamine-polyethyleneglycol (mol. wt.  
3000) with N-(6-maleamidobutyloxy) succinic acid imide, and N,N'-  
carbonyldiimidazole was demonstrated. Liposomes prepd. from egg yolk  
phosphatidylcholine, cholesterol, a  
dipalmitoylphosphatidylethanolamine were treated with III to prep.  
functional liposomes having av. particle  
size of 184 nm (CV value 17%), or 188 nm (CV value 18%) after storage  
at 5.degree. for 3 wk. The liposomes prepd. with the methods exhibit  
improved stability and thus are useful for drug delivery system.

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[(1H-imidazol-1-yl)carbonyl]-  
.omega.-[3-  
[[4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-  
oxobutyl]amino]propoxy]-  
(9CI) (CA INDEX NAME)



RN 179810-79-8 HCAPLUS

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[(1H-imidazol-1-yl)carbonyl]-  
.omega.-[3-  
[[6-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-  
oxohexyl]amino]propoxy]-  
(9CI) (CA INDEX NAME)

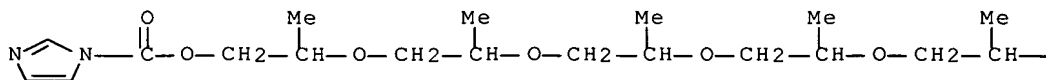


RN 179810-80-1 HCAPLUS

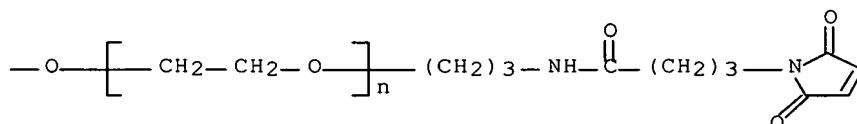
CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[3-[[4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-

1H-pyrrol-  
 1-yl)-1-oxobutyl]amino]propyl]-.omega.-[[16-(1H-imidazol-1-yl)-  
 1,4,7,10,13-  
 pentamethyl-16-oxo-3,6,9,12,15-pentaoxahexadec-1-yl]oxy]- (9CI)  
 (CA INDEX  
 NAME)

PAGE 1-A

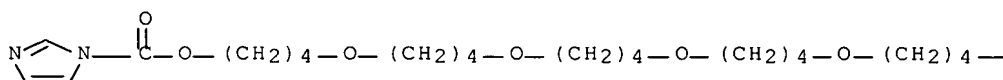


PAGE 1-B

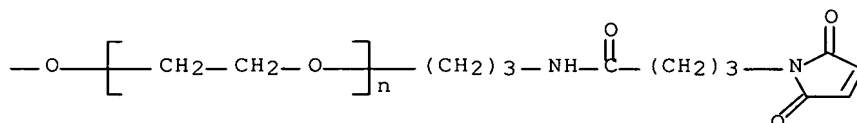


RN 179810-81-2 HCAPLUS  
 CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[3-[[4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-  
 1H-pyrrol-  
 1-yl)-1-oxobutyl]amino]propyl]-.omega.-[[26-(1H-imidazol-1-yl)-26-  
 oxo-  
 5,10,15,20,25-pentaoxahexacos-1-yl]oxy]- (9CI) (CA INDEX NAME)

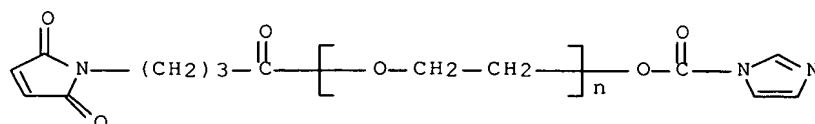
PAGE 1-A



PAGE 1-B



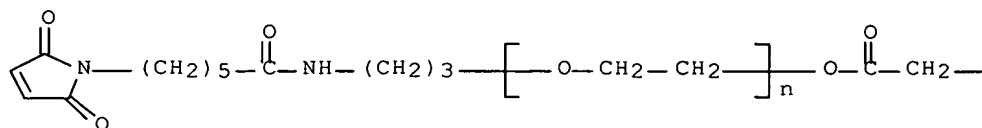
RN 179810-82-3 HCAPLUS  
 CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[4-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-  
 pyrrol-1-  
 yl)-1-oxobutyl]-.omega.-[[ (1H-imidazol-1-yl)carbonyl]oxy]- (9CI)  
 (CA  
 INDEX NAME)



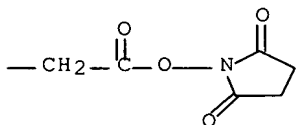
RN 179810-83-4 HCAPLUS  
 CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[3-[[6-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-  
 1H-pyrrol-  
 1-yl)-1-oxohexyl]amino]propyl]-.omega.-[4-[(2,5-dioxo-1-  
 pyrrolidinyl)oxy]-

1,4-dioxobutoxy]- (9CI) (CA INDEX NAME)

PAGE 1-A



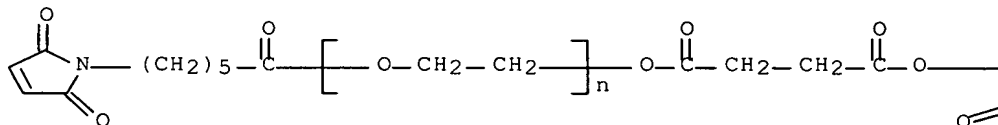
PAGE 1-B



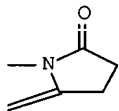
RN 179810-84-5 HCAPLUS

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[6-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-oxohexyl]-.omega.-[4-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-1,4-dioxobutoxy]- (9CI) (CA INDEX NAME)

PAGE 1-A



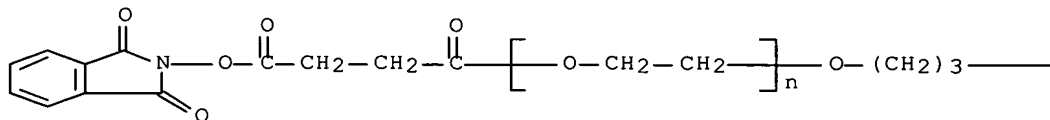
PAGE 1-B

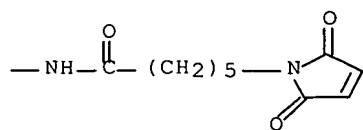


RN 179810-85-6 HCAPLUS

CN Poly(oxy-1,2-ethanediyl), .alpha.-[4-[(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)oxy]-1,4-dioxobutyl]-.omega.-[3-[[6-(2,5-dihydro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)-1-oxohexyl]amino]propoxy]- (9CI) (CA INDEX NAME)

PAGE 1-A





(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-117586

(43) 公開日 平成8年(1996)5月14日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 13/02				
A 6 1 K 9/127	D	9342-4D	B 0 1 J 13/ 02	Z

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平6-264221

(22) 出願日 平成6年(1994)10月27日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 宮崎 剛

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 杉中 昭典

神奈川県茅ヶ崎市室田2-4-10

(72) 発明者 門磨 義仁

茨城県土浦市真鍋2-8-25

(74) 代理人 弁理士 柳原 成

(54) 【発明の名称】 反応性小胞体、小胞体修飾剤および製造方法

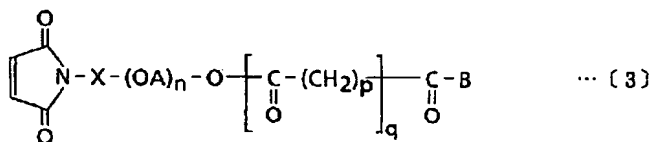
(57) 【要約】

【目的】 チオール基と特異的に反応するマレイミド基を有するポリオキシアルキレン鎖がリポソームの外表面にのみ結合し、内側には存在しない反応性リポソームを得る。

\*

\* 【構成】 アミノ基を有するリン脂質を膜形成成分として含むリポソームに、下式で表わされるポリオキシアルキレン誘導体を反応させる。

【化1】



(OAは炭素数2~4のオキシアルキレン基、nは1~1000、Xは2価の有機残基、pは1~6、qは0ま

たは1、Bはアミノ基に対する反応活性基)

1

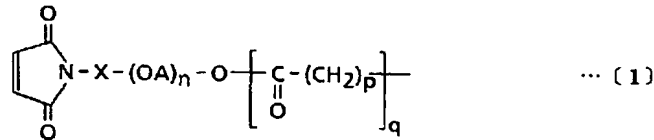
2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体において、小胞体の外表面に存在\*

\*する前記アミノ基に対するウレタン結合またはアミド結合により、一般式〔1〕

【化1】

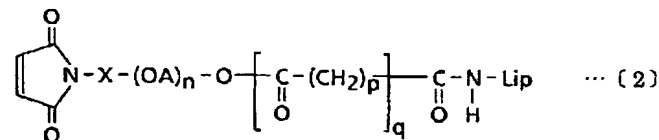


〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、  
nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なっているもよく、またランダム状に付加しているも、ブロック状に付加しているもよい。  
Xは2価の有機残基、

※pは1～6の整数、

10 qは0または1を表わす。〕で表わされる反応活性基を有する（ポリ）オキシアルキレン鎖が、小胞体の外表面にのみ結合した反応性小胞体であって、一般式〔2〕

【化2】



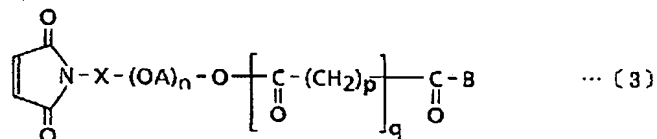
〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、  
nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なっているもよく、またランダム状に付加しているも、ブロック状に付加しているもよい。  
Xは2価の有機残基、  
pは1～6の整数、

20★qは0または1、

Lip-NH-はアミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体を表わす。〕で表わされる構造を有することを特徴とする反応性小胞体。

【請求項2】 一般式〔3〕

【化3】



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、  
nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なっているもよく、またランダム状に付加しているも、ブロック状に付加しているもよい。  
Xは2価の有機残基、  
pは1～6の整数、  
qは0または1、  
Bはアミノ基に対する反応活性基を表わす。〕で表わされる（ポリ）オキシアルキレン誘導体からなることを特徴とする請求項1記載の反応性小胞体製造用の小胞体修飾剤。

【請求項3】 アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体に、請求項2記載の小胞体修飾剤を水系溶媒中で反応させることを特徴とする請求項1記載の反応性小胞体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、反応性小胞体、これを

製造するための小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法に関する。さらに詳しくは医薬の運搬体、検査薬、診断薬、アジュバント、センサー、固定化触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素子、化粧品、マイクロカプセル代替品など、種々の機能性リボソームまたは脂肪乳剤等として有用な反応性小胞体、これを製造するための小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 リボソームはリン脂質の二分子膜からなる小胞体であり、多分野での応用が試みられている。特に、医薬運搬体、診断・検出用のセンサーなどへの応用が注目されているが、リボソーム外表面上または膜中に機能性物質を固定して各種機能をもたせること、およびリボソームの血中濃度を維持することなどが大きな課題となっている。

【0003】 従来、リボソーム外表面上または膜中への機能性物質の固定化に関しては、プルラン誘導体で被覆したリボソームの外表面上の多糖上に置換したアミノエ

チルカルバミルメチル基にγ-マレイミドブチルオキシサクシニミジルを介して抗体フラグメントを結合させる方法 (Biochem. Biophys. Acta., 898, 323(1987))、あるいはあらかじめリボソーム膜形成成分中に糖脂質を加えておき、リボソーム形成後過よう素酸化を行い、生じたアルデヒド基と抗体とを反応させて固定化する方法 (J. Biol. Chem., 255, 10509(1980)) などがある。

【0004】しかし、これらの従来法では、リボソーム調製後にリボソーム膜外表面上での多段階の化学反応を行う必要があり、このため目的とする機能性物質の導入量が低く制限され、また反応による副生成物や不純物が混入し、リボソーム膜へのダメージが大きいなどの問題点がある。

【0005】一方、リボソームを生体内へ投与したとき、その多くは肝臓、脾臓などの網内系器官で捕捉されるため、十分な効果が得られないことが指摘されている (Cancer Res., 43, 5328(1983))。そこで、この網内系器官で捕捉されてしまう問題点や、リボソームに封入した薬剤のもれ防止、あるいはリボソーム自身の崩壊性・凝集性など安定性の低さに関する問題点を改善する方法として、リボソームの外表面にポリエチレングリコール鎖を導入することが試みられている (例えば、特開平1-249717号公報、FEBS letters, 268, 235(1990))。また、ポリエチレングリコールで修飾されたりリボソームは、長期間にわたり血液中濃度を維持できることが明らかになっている (Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991))。しかし、このような方法により得られるポリエチレングリコール鎖の導入されたりリボソームは機能性物質と反応しないので、リボソーム外表面上に機能性物質を固定化することはできない。

【0006】さらに、米国特許第4483929号には、抗体を化学結合により担持した抗体担持リボソームが開示されている。この抗体担持リボソームは、反応活\*

\*性基としてオキシカルボニルイミダゾール基を有する糖脂質を膜形成成分とする反応性リボソームと抗体とを反応させることにより得られる。

【0007】しかし、この抗体担持リボソームでは、リボソームの内表面 (内側) にも反応活性を有するオキシカルボニルイミダゾール基が存在することになり、このためこのようなリボソームをドラッグデリバリーシステム (DDS) 用の医薬運搬体などとして用いた場合、生体内でリボソームが崩壊した際内側に存在していたオキシカルボニルイミダゾール基が生体内のタンパク質などと反応し、副作用や毒性を起こすなどの危険性がある。またリボソームに封入した医薬と内側のオキシカルボニルイミダゾール基とが反応し、期待される医薬効果が得られないなどの問題点もある。

【0008】

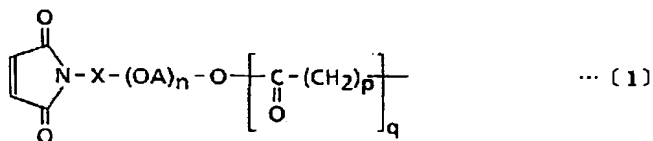
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記問題点を解決するため、チオール基と特異的に反応する反応活性基を先端に有する (ポリ) オキシアルキレン鎖が小胞体の外表面 (外側) にのみ存在し、内側には反応活性基が存在しない反応性小胞体であって、機能性物質を一段階の反応で固定化することができ、しかも固定した機能性物質の作用を十分に発揮させることができる反応性小胞体、これを製造するための小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は次の反応性小胞体、小胞体修飾剤、および反応性小胞体の製造方法である。

(1) アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体において、小胞体の外表面に存在する前記アミノ基に対するウレタン結合またはアミド結合により、一般式〔1〕

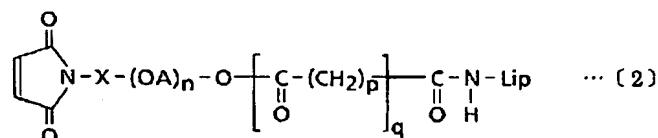
〔化4〕



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。X※

※は2価の有機残基、pは1～6の整数、qは0または1を表わす。〕で表わされる反応活性基を有する (ポリ) オキシアルキレン鎖が、小胞体の外表面にのみ結合した反応性小胞体であって、一般式〔2〕

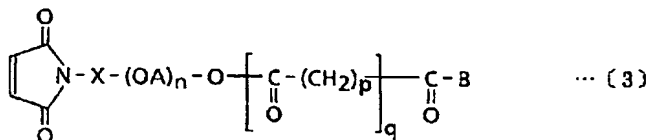
〔化5〕



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000

0の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に

付加していても、ブロック状に付加していてもよい。Xは2価の有機残基、pは1～6の整数、qは0または1、 $\text{Lip-NH-}$ はアミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体を表わす。)で表わされる\*



〔式中、OAは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nはオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。nが2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。Xは2価の有機残基、pは1～6の整数、qは0または1、Bはアミノ基に対する反応活性基を表わす。〕で表わされる(ポリ)オキシアルキレン誘導体からなることを特徴とする上記(1)記載の反応性小胞体製造用の小胞体修飾剤。(3)アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体に、上記(2)記載の小胞体修飾剤を水系媒中で反応させることを特徴とする上記(1)記載の反応性小胞体の製造方法。

【0010】本発明において、「(ポリ)オキシアルキレン」はオキシアルキレンまたはポリオキシアルキレンを意味する。本発明において小胞体とは、小胞体形成成分の親水基が界面の水相に向って配向した構造を有する粒子を意味する。本発明においては、小胞体はアミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含有しているので、反応性小胞体を製造する前の小胞体には、外表面にアミノ基が存在している。小胞体の具体的なものとしては、二分子膜からなる閉鎖小胞であるリポソーム、植物油およびリン脂質などの混合物が乳化された脂肪乳剤、またはミセルなどがあげられる。

【0011】本発明の反応性小胞体は、一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する(ポリ)オキシアルキレン鎖が、小胞体の外表面にのみ結合した小胞体であり、内側または内表面(以下、両者をまとめて内側という)には反応活性基を有する鎖は結合していない。反応活性基を有する(ポリ)オキシアルキレン鎖は、一般式〔2〕に示されているように、ウレタン結合(—OC(=O)NH—)またはアミド結合(—C(=O)NH—)により小胞体の外表面にのみ結合している。

【0012】一般式〔1〕～〔3〕のOAで表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、

\*構造を有することを特徴とする反応性小胞体。

(2)一般式〔3〕

〔化6〕

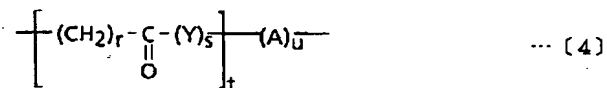
10 テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。

【0013】一般式〔1〕～〔3〕のnはオキシアルキレン基の平均付加モル数を表わし、1～1000、好ましくは4～500、さらに好ましくは10～230の正数である。nが2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のものでも、異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。

20 【0014】(ポリ)オキシアルキレン鎖は親水性であるのが好ましく、この場合OAとしてはエチレンオキシドが単独で付加したもの、エチレンオキシドとテトラヒドロフランおよび/またはプロピレンオキシドとがランダム状またはブロック状に付加したものなどが好ましく、特にエチレンオキシドが単独で4以上付加したものが好ましい。種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。(ポリ)オキシアルキレン鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

30 【0015】一般式〔1〕～〔3〕においてXで表わされる2価の有機残基としては、例えば一般式〔4〕

〔化7〕

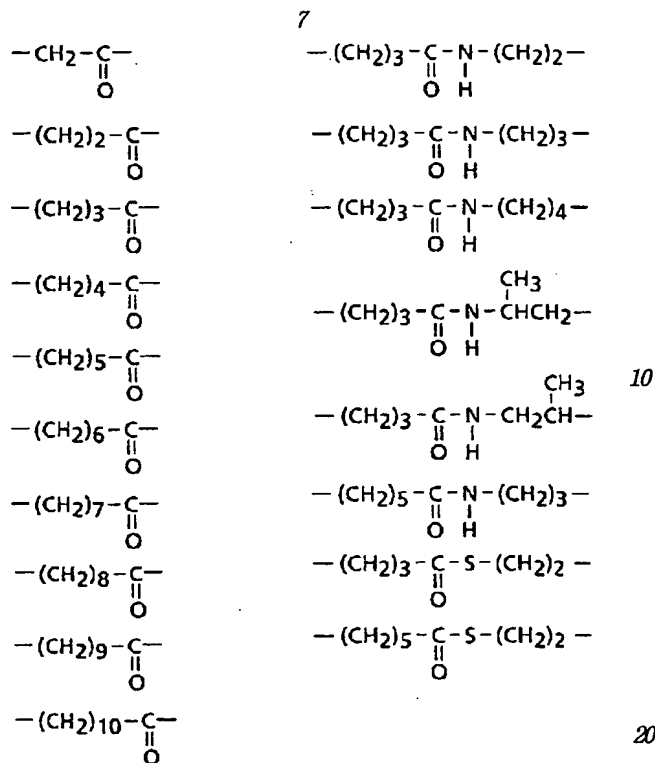


〔式中、Aは炭素数2～4のアルキレン基、Yは酸素原子、イオウ原子または第2級アミノ基、rは1～10の整数、s、tおよびuは0または1を表わす。ただし、tとuとが同時に0になることはない。〕で表わされる基などがあげられる。

【0016】一般式〔4〕で表わされるXの具体的なものとしては、例えば次のものがあげられる。

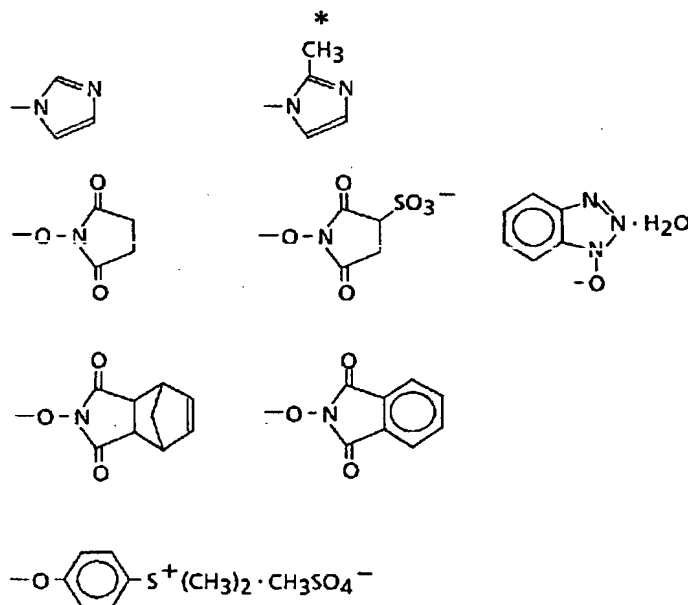
〔化8〕





\*【0017】一般式〔3〕においてBで表わされる基はアミノ基に対して反応活性を有する反応活性基であり、例えばイミダゾール基およびその置換体、あるいは活性化エステル残基などがあげられる。具体的なものとしては、次の基などがあげられる。

【化9】



【0018】一般式〔1〕～〔3〕において、マレイミド基部分はチオール基に対して特異的に高い反応性を有している反応活性基部分である。このため本発明の反応性小胞体は、小胞体の外表面において、(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端にチオール基を有する機能性物質を、容易に共有結合により結合させることができる。

【0019】本発明の反応性小胞体は、アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体に、一般式〔3〕で表わされる小胞体修飾剤を反応させることにより製造することができる。アミノ基を有するリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルスレオニンなどがあ

げられ、一種単独で、または二種以上組合せて使用できる。これらのリン脂質としては、2つの脂肪酸エステル部位に炭素数4～30、好ましくは8～18の飽和または不飽和の脂肪酸を有するものが望ましく、天然または合成のいずれのものでもよい。具体的には、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミチルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリスチルホスファチジルセリン、ジパルミチルホスファチジルセリン、ジステアロイルホスファチジルセリン、ジミリスチルホスファチジルスレオニン、ジパルミチルホスファチジルスレオニン、ジステアロイルホスファチジルスレオ

ニンなどがあげられる。

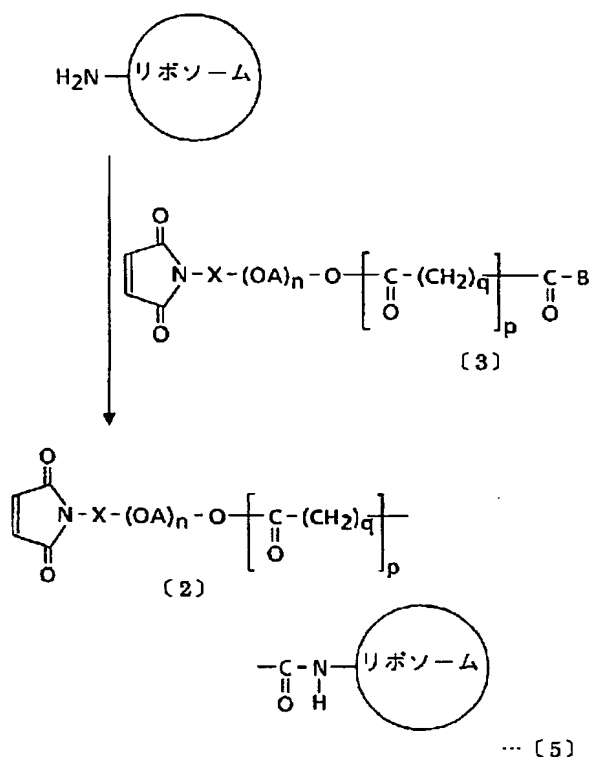
【0020】小胞体形成成分としては、アミノ基を有するリン脂質の他にも小胞体を形成しうる他の化合物も使用でき、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、その他のリン脂質類、コレステロール、イントラリピッド（大塚製薬（株）、商標）、大豆油、サフラワー油など、従来から小胞体の形成成分として用いられているものが使用できる。また小胞体としては上記イントラリピッドのような脂質混合乳化物を使用することもできる。

【0021】全小胞体形成成分中に占めるアミノ基を有するリン脂質の割合は、通常0.01～100モル%とするのが好ましく、アミノ基を有するリン脂質の割合を多くするほど、一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖の量を多くすることができる。これにより小胞体の外表面に存在する反応活性基を有する（ポリ）オキシアルキレン鎖の量を所望の値に調節することができる。

【0022】小胞体と一般式〔3〕で表わされる小胞体修飾剤との反応は、水系溶媒、例えば蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の種々の緩衝液；これらの水系溶媒と、エタノール、メタノール、1,4-ジオキサン等の有機溶媒との混合溶媒中で、pH1～12、好ましくはpH7～10、反応温度0～100℃、好ましくは0～60℃で、反応時間30分間～200時間、好ましくは1時間～24時間の条件で行うことができる。このようにして反応させることにより、小胞体外表面のアミノ基と小胞体修飾剤のアミノ基に対する活性基部分とが反応してウレタン結合またはアミド結合を形成し、一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖が小胞体外表面に導入され、一般式〔2〕で表わされる構造を有する反応性小胞体が得られる。

【0023】アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分（膜形成成分）として含むリボソームと小胞体修飾剤とから反応性リボソームを製造する反応式は次の〔5〕式で示される。

〔化10〕



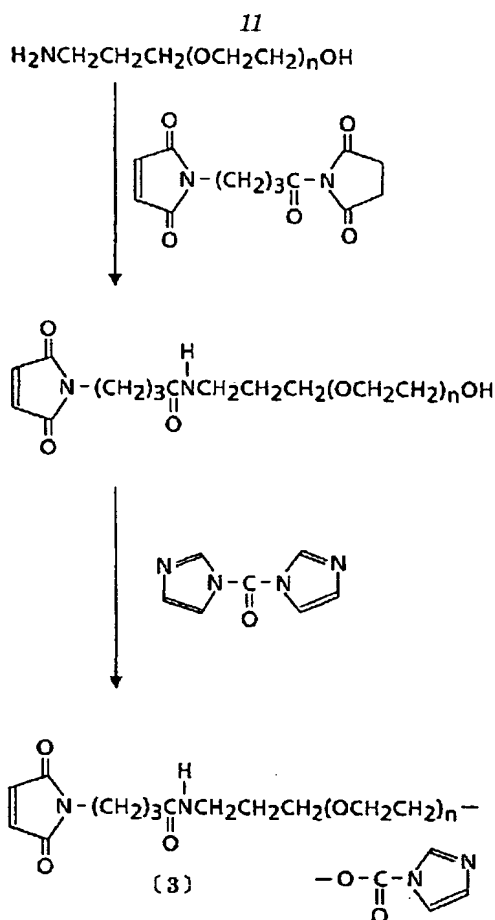
【0024】このようにして得られた本発明の反応性小胞体は、ゲルろ過、透析、限外ろ過、遠心分離などの方法により容易に単離・精製することができる。このように本発明の製造方法では、調製済みの小胞体に、後から反応活性基を有する鎖を導入しているので、小胞体の外表面にのみ反応活性基を有する鎖が存在し、内側には存在しない反応性小胞体得られる。

【0025】本発明の小胞体修飾剤は、水溶性であることが好ましい。従って、一般式〔3〕中のOAとしては、前記のようにエチレンオキシドが単独で付加したもの、あるいはエチレンオキシドとテトラヒドロフランおよび／またはプロピレンオキシドとがランダム状またはブロック状に付加したものなどが好ましく、特にエチレンオキシドが単独で4以上付加したものが好ましい。

【0026】本発明の小胞体修飾剤は、例えば下記反応式〔6〕に示すように、 $\alpha$ -プロピルアミン- $\omega$ -ヒドロキシーポリオキシエチレンとN-(6-マレイミドブチリルオキシ)コハク酸イミドとを反応させた後、さらにN,N'-カルボニルジイミダゾールを反応させるなどの方法により容易に製造することができる。これらの反応は、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ベンゼン、クロロホルム、塩化メチレンなどの有機溶媒中、-100～+100℃、好ましくは0～+60℃、10分間～200時間、好ましくは30分間～12時間反応させることにより行うことができる。

〔0027〕

〔化11〕



... [6]

【0028】得られた反応混合物は、精製することなくそのまま、あるいは再沈殿、カラム、ゲルろ過、限外ろ過、透析などの方法により単離・精製した後、小胞体修飾剤として使用される。

【0029】次にそれぞれの反応性小胞体について詳しく説明する。まず代表的な反応性小胞体である反応性リポソームについて説明する。本発明に係る反応性リポソームは膜を構成するいちばん外側の膜の外表面にのみ一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖が存在し、それ以外には存在しない反応性リポソームである。

【0030】反応性リポソームを構成する膜形成成分（小胞体形成成分）としては、前記アミノ基を有するリン脂質の他に、従来からリポソームの膜形成成分として用いられているものが制限なく使用できる。具体的には、ジホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ホスファチジルイノシトール、大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール等のリン脂質および脂肪酸部に不飽和基を有する重合性リン脂質；スルホキシリポシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ラクシルジグリセリド等の糖脂質類；コレステロール等の非極性脂質；その他には、非イオン性界面活性剤、ホスファチジルポリエテ

12

ングリコール、「Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1990)」に記載されているホスファチジルエタノールアミンとポリエチレングリコールとの反応物、およびこれらの混合物などがあげられる。

【0031】全膜形成成分中に占めるアミノ基を有するリン脂質の割合は、通常0.01～100モル%、好ましくは0.1～50モル%とするのが望ましい。0.01モル%未満の場合、リポソーム外表面に存在する一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖の導入量が少なくなり、このためリポソーム外表面に共有結合させる機能性物質の量が少なくなるので好ましくない。

【0032】小胞体修飾剤と反応させる前のリポソームは、エクストルージョン法、ボルテックスミキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆層蒸発法、エタノール注入法、プレベシクル法、フレンチプレス法、W/O/Wエマルジョン法、アニーリング法、凍結融解法など、種々の公知の方法により製造することができる。また、これらの製造法を選択することにより、多重層リポソーム、小さな一枚膜リポソーム、大きな一枚膜リポソームなど、種々の大きさや形態を有するリポソームを製造することができる。このような方法により、リポソームの外表面および内側にアミノ基が存在するリポソームが得られる。

【0033】リポソームの内部には、一般のリポソームと同様に種々の物質を公知の方法により封入することが可能である。被封入物質としては、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物、電極感応性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬；ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸等の水溶性高分子類；ホスファチジルセリン等のリン脂質；これらの混合物などがあげられる。

【0034】上記のようなリポソームと一般式〔3〕で表わされる小胞体修飾剤とを前記のようにして反応させることにより、反応性リポソームが得られる。この場合、全反応溶液中のリポソームの膜構成成分濃度は、0.001～1000mg/ml、好ましくは0.1～100mg/mlとするのが望ましく、また小胞体修飾剤の濃度は特に限定されないが、0.001～1000mg/ml、好ましくは0.01～500mg/mlとするのが望ましい。小胞体修飾剤の使用量が上記下限値より少ない場合、得られた反応性リポソームは外表面に共有結合させる機能性物質の量が少なくなるので好ましくない。一方、上限値を超えると反応溶液の粘度が高くなり、リポソームの安定性が低下するため好ましくない。

【0035】なお、リポソーム外表面のアミノ基の全量

を小胞体修飾剤と反応させる必要がない場合、またはリボソームに導入される(ポリ)オキシアルキレン鎖の先端の全てが反応活性基である必要がない場合には、アミノ基ブロック化剤、例えば片末端には反応性基を持たず、もう片末端にのみアミノ基に対する反応性基を有する(ポリ)オキシアルキレン誘導体、具体的には $\alpha$ -メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)- $\omega$ -メトキシポリオキシエチレン、 $\alpha$ -N-カルボニルイミダゾール- $\omega$ -メトキシポリオキシエチレン、または小胞体修飾剤を製造した際に副生した片末端にのみアミノ基に対する反応活性基が導入された(ポリ)オキシアルキレン誘導体などを、リボソーム外表面のアミノ基と反応させて、アミノ基をブロックすることができる。このようなアミノ基のブロック化は、反応性リボソームを製造する際の反応溶液中にアミノ基ブロック化剤を添加して行うこともできるし、小胞体修飾剤と反応させる前に行うこともできるし、または小胞体修飾剤と反応させた後に行うこともできる。このようにリボソーム外表面のアミノ基をブロックすることにより、リボソーム外表面に導入される一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖の量を所望の値に調節することができる。

【0036】このようにして得られた反応性リボソームは、リボソーム膜の外表面に(ポリ)オキシアルキレンからなるスパーサーを介してマレイミド基が結合しているので、チオール基を有する機能性物質を効率よくかつ簡単に、リボソームの二分子膜の外表面上に(ポリ)オキシアルキレンからなるスパーサーを介して、化学的に固定化することができる。

【0037】反応性リボソームに固定化できる機能性物質としては、チオール基を有するまたはチオール基を導入した物質であれば特に限定されず、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合

物、電極感応性化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬；ホスファチジルセリン等のリン脂質；これらの混合物などがあげられる。特に抗体を用いる場合には、抗体、例えばIgGをババインまたはペプシンなどの酵素で消化した後、メルカプトエタノールなどで還元して得られるフラグメントを用いることができる。

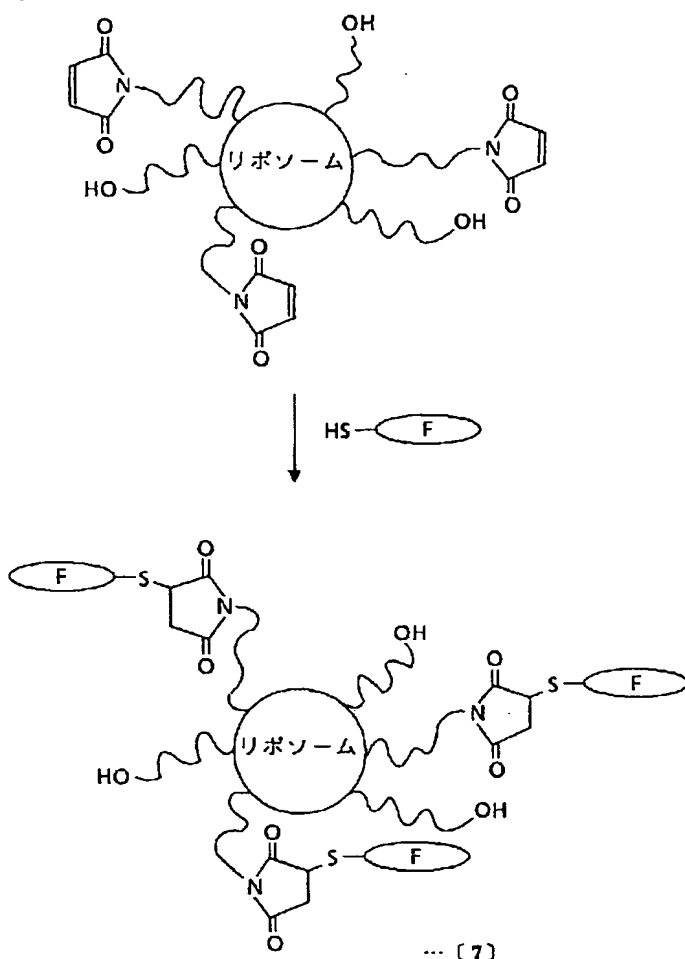
10 【0038】反応性リボソーム外表面への機能性物質の固定化反応は、水系溶媒、例えば蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の種々の緩衝液；これらの水系溶媒とアセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド、ピロリドン等の有機溶媒との混合溶媒中で、反応性リボソームと機能性物質とをpH1~12、好ましくはpH5~10、反応温度0~100℃、好ましくは0~60℃で、反応時間30分間~200時間、好ましくは1分間~24時間の条件で、攪拌下に反応させる方法などにより、一段階で容易に行うことができる。この場合、反応条件は温和であり、しかも一段階で行うことができるので、得られるリボソームの安定性は高い。なお上記の条件外では、リボソームの安定性が悪くなるため好ましくない。固定化反応の終了後は、必要によりゲル濾過、限外濾過、透析、遠心分離、静置沈降分離等の方法により精製を行うことができる。

20 【0039】リボソーム外表面上でのチオール基を有する機能性物質の固定化反応を模式的に示すと下式〔7〕のようになる。式中、波線は(ポリ)オキシアルキレン鎖、Fは機能性物質を示す。

【化12】

15

16



【0040】機能性物質を固定化したリポソームは、  
 (ポリ) オキシアルキレン鎖の先端に機能性物質が固定  
 されているので(ポリ) オキシアルキレン鎖の長さを調  
 節することにより機能性物質の作用を十分に発揮させる  
 ことができる。また、(ポリ) オキシアルキレン鎖が導  
 入されているので、従来からの(ポリ) オキシアルキレ  
 ン鎖導入の効果、例えば長期間にわたる血液中濃度の維  
 持、非免疫原生、リポソーム内部に封入した物質の漏れ  
 防止などの効果も期待できる。さらにリポソームの内側  
 (内表面) には反応活性の高い基は存在しないので、D  
 DS用の医薬運搬体、診断薬、アジュバントなど、生体  
 内に投与する機能性リポソームとして用いても生体内の  
 官能基とは反応せず、副作用や毒性を示す危険性がない  
 ほか、封入した機能性物質とも反応しない。このほか、  
 不必要なマレイミド基が残存したとしても、チオグリコ  
 ール酸、メルカプトプロピオン酸、システインなどのチ  
 オール基を有する化合物を反応させてキャッピングを行  
 う方法などにより、その全てを容易に失活させることが  
 できる。

【0041】このため反応性リポソームは、医薬の運搬  
 体、検査薬、診断薬、アジュバント、センサー、固定化  
 触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素

子、化粧品、マイクロカプセル代替品など、種々の機能  
 性リポソームとして利用できる。これらの中でも、医薬  
 の運搬体、診断薬、アジュバントなどの生体内に投与す  
 る機能性リポソームとして好適に利用できる。

【0042】なお、リポソームを製造する際、膜形成成  
 分として重合性リン脂質を配合することにより、重合性  
 の反応性リポソームとすることができる。重合性のリン  
 脂質としては、公知の重合性リン脂質を使用することが  
 できるが、例えば1, 2-ジ(2, 4-オクタデカジエ  
 ノイル)-3-ホスファチジルコリンの他、野島庄七、  
 砂本順三、井上圭三編集、1988年南雲堂発行の「リ  
 ポソーム」p313~315に記載のものなどがあげら  
 れる。これらの中では、1, 2-ジ(2, 4-オクタデ  
 カジエノイル)-3-ホスファチジルコリンが好まし  
 い。

【0043】重合性リポソームは、リポソーム調製後  
 に、光重合開始剤の存在下または非存在下でUV、 $\gamma$   
 線、電子線などの光照射を行うことにより、あるいはレ  
 ドックス開始剤系により、あるいはアゾ系開始剤または  
 有機過酸化物などの存在下で加熱を行うことにより、容  
 易に重合を行うことができる。このようにして得られた  
 重合後のリポソームは、優れた安定性を有しているの

で、水溶液に分散させたままで、あるいは凍結乾燥等により粉末状に調製し、安定して使用することができる。

【0044】他の反応性小胞体としての反応性脂肪乳剤は、アミノ基を有するリン脂質と、大豆油、サフラワー油等の植物油と、必要により添加される他の添加剤、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン等のリン脂質、イントラリピッド（大塚製薬（株）製、商標）、乳化補助剤、安定化剤、等強化剤、脂溶性医薬、脂溶性生理活性物質などを含む油脂混合物が外表面にのみ一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖が存在するものである。

【0045】小胞体修飾剤との反応前の脂肪乳剤は、公知の方法により製造することができる。例えば、アミノ基を有するリン脂質、植物油、および必要により配合する添加剤を混合、加熱し、水を加えてホモミキサー等で粗乳化し、次にマントン-ガウリン型の加圧噴射式ホモジナイザー等で均質化する方法などにより製造することができる。また脂肪乳剤としては、上記イントラリピッドのような脂質混合乳化物を使用することもできる。

【0046】このようにして得られた小胞体修飾剤との反応前の脂肪乳剤と一般式〔3〕で表わされる小胞体修飾剤とを、反応性リポソームの場合と同様にして反応させることにより、本発明に係る反応性脂肪乳剤が得られる。反応性脂肪乳剤は反応性リポソームと同様にして、同様の機能性物質を容易に固定化することができる。このため反応性脂肪乳剤は、医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサー、化粧品、固定化触媒などとして利用できる。

【0047】上記以外の反応性小胞体である反応性ミセルは、アミノ基を有するリン脂質が単独で、または他の成分、例えばホスファチジルコリン、その他のリン脂質類、コレステロールなどがミセル化し、外表面にのみ一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する鎖が存在する状態でミセル化したものである。反応性ミセルも反応性脂肪乳剤と同様にして機能性物質を固定化することができ、また同様の用途に利用できる。

【0048】

【発明の効果】本発明の反応性小胞体は、反応活性基が小胞体の外表面にのみ存在し、内側には存在していないので、機能性物質を固定化した小胞体中には反応活性基が残存せず、このため生体内に投与しても生体内の官能基とは反応が起らず、副作用や毒性を起す危険性がない。また機能性物質の固定化は簡単にかつ効率よく行うことができ、しかも小胞体の安定性を低下させることはない。さらに（ポリ）オキシアルキレン鎖の長さを調節することにより、固定化した機能性物質の作用を十分に発揮させることができる。

【0049】本発明の小胞体修飾剤は、上記のような反応性小胞体を製造するための原料として用いることにより、簡単な操作で、小胞体の外表面にのみ一般式〔1〕で表わされる反応活性基を有する（ポリ）オキシアルキ

レン鎖を結合させることができる。

【0050】本発明の反応性小胞体の製造方法では、アミノ基を有するリン脂質を小胞体形成成分として含む小胞体に、上記小胞体修飾剤を反応させるだけで、簡単に効率よく、しかも小胞体の安定性を低下させることなく前記のような反応性小胞体を製造することができる。

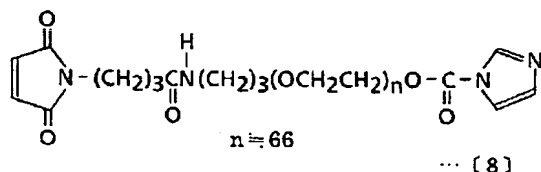
【0051】

【実施例】以下実施例によりさらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 10 合成例1

1, 4-ジオキサン10ml中に、 $\alpha$ -ヒドロキシー $\omega$ -プロピルアミン-ポリエチレングリコール（分子量約3000）1g（333 $\mu$ mol）およびN-（6-マレイミドブチリルオキシ）コハク酸イミド140mg（500 $\mu$ mol）を加え、4℃で6時間攪拌した。さらに、N, N'-カルボニルジイミダゾール81mg（500 $\mu$ mol）を加え、4℃で12時間攪拌した。反応終了後、濾過し、得られた濾液に蒸留水50mlを加え、さらに限外濾過（分画分子量3000）により精製した。これを凍結乾燥し、下式〔8〕で表わされる白色粉末状の目的の反応性ポリオキシアルキレン誘導体を得た（収率78%）。

【化13】



#### 30 【0052】実施例1-1

卵黄ホスファチジルコリン20mg（26 $\mu$ mol）、コレステロール3.9mg（10 $\mu$ mol）およびジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン2.8mg（4 $\mu$ mol）をナス型フラスコに入れ、2mlのベンゼンで溶解させた後、凍結乾燥を行った。これに生理的食塩水1mlを加え、バス型超音波照射およびボルテックスミキサーにより、多重層リポソームを得た。さらにエクストルuderにより3.0 $\rightarrow$ 1.0 $\rightarrow$ 0.2 $\mu$ mのポリカーボネートメンブランを順次通過させることにより、大きな一枚膜リポソームを得た。

40

【0053】次に、得られたリポソーム懸濁液の500 $\mu$ lに、合成例1で得られた反応性ポリオキシアルキレン誘導体を10wt%の濃度で含む生理的食塩水1mlを加え、pH7.4において室温で6時間反応させ、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がウレタン結合により外表面に導入された反応性リポソームを得た。反応終了後、Sephadex G-50を用いてゲル濾過を行い、含リポソーム分画を分取し、反応性リポソームを得た。得られた反応性リポソームの粒径をレーザー散乱粒度分布計（NICOMP社製、NICOMP 3

19

70 HPL、商標)を用いて測定したところ、平均粒径は184 nm (CV値17%)であった。さらに、5℃で3週間保存した後粒径を測定した結果、平均粒径は188 nm (CV値18%)であった。このことから、上記反応性リポソームは安定性に優れていることがわかる。

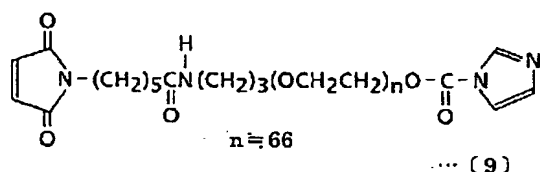
#### 【0054】実施例1-2

実施例1-1と同様にして、ただし反応性ポリオキシアルキレン誘導体の10wt%を含む生理的食塩水に代えて、同様の反応性ポリオキシアルキレン誘導体5wt%を含む生理的食塩水を用いて、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がウレタン結合により外表面に導入された反応性リポソームを得た(平均粒径189 nm、CV値18%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は192 nm (CV値20%)であり、安定性に優れていた。

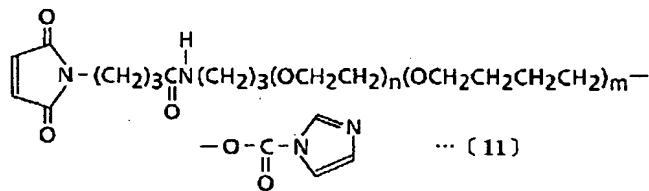
#### 【0055】実施例1-3

実施例1-1と同様にして、ただし下式〔9〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体5wt%およびα-メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)-ω-メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)10wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がウレタン結合により外表面に導入された反応性リポソームを得た(平均粒径193 nm、CV値18%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は196 nm (CV値20%)であり、安定性に優れていた。

#### 【化14】



30



m=5、n=40(ブロック共重合体)

#### 【0058】実施例1-6

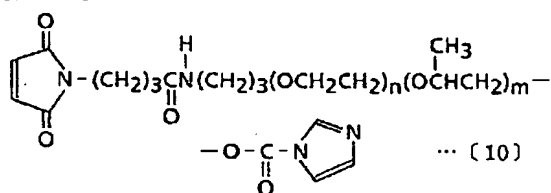
実施例1-1と同様にして、ただし下式〔12〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体5wt%およびα-メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)-ω-メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)10wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がウレタン結合により外表面に導入された反応性リポソームを得た(平均粒径188 nm、CV値16%)。また、5℃で

20

#### \*【0056】実施例1-4

実施例1-1と同様にして、ただし下式〔10〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体(ランダム共重合体;分子量約2100)5wt%およびα-メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)-ω-メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)10wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシアルキレン鎖がウレタン結合により外表面に導入された反応性リポソームを得た(平均粒径191 nm、CV値19%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は197 nm (CV値20%)であり、安定性に優れていた。

#### 【化15】



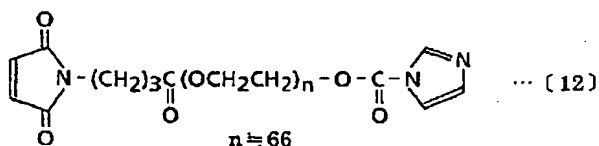
m=5、n=40(ランダム共重合体)

#### 【0057】実施例1-5

実施例1-1と同様にして、ただし下式〔11〕で表わされる反応性ポリオキシアルキレン誘導体5wt%およびα-メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)-ω-メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)10wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシアルキレン鎖がウレタン結合により外表面に導入された反応性リポソームを得た(平均粒径187 nm、CV値17%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は190 nm (CV値19%)であり、安定性に優れていた。

#### 【化16】

#### 【化17】



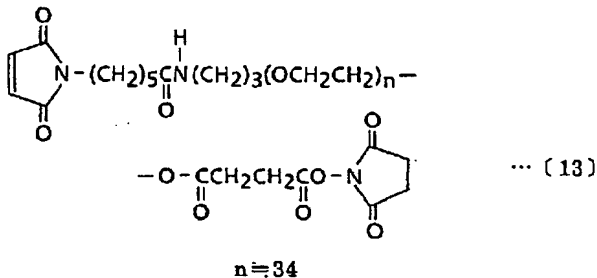
n=66

#### 【0059】実施例1-7

21

実施例1-1と同様にして、ただし下式〔13〕で表わされるポリオキシアルキレン誘導体5wt%および $\alpha$ -メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)- $\omega$ -メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)10wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がアミド結合により外表面に導入された反応性リボソームを得た(平均粒径181nm、CV値18%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は189nm(CV値19%)であり、安定性に優れていた。

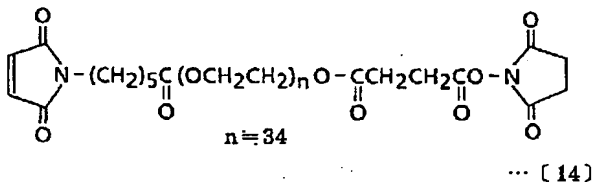
【化18】



【0060】実施例1-8

実施例1-1と同様にして、ただし下式〔14〕で表わされるポリオキシアルキレン誘導体5wt%および $\alpha$ -メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)- $\omega$ -メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)10wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がアミド結合により外表面に導入された反応性リボソームを得た(平均粒径187nm、CV値16%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は191nm(CV値18%)であり、安定性に優れていた。

【化19】



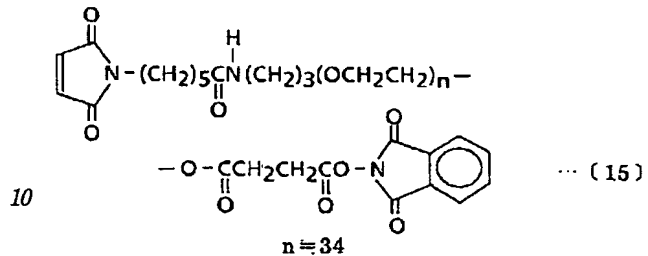
【0061】実施例1-9

実施例1-1と同様にして、ただし下式〔15〕で表わされるポリオキシアルキレン誘導体1wt%および $\alpha$ -メチルカルボニル(N-オキシコハク酸イミド)- $\omega$ -メトキシポリオキシエチレン(分子量約3000)5wt%を含む生理的食塩水1mlを用いて、マレイミド基を有するポリオキシエチレン鎖がアミド結合により外表面に導入された反応性リボソームを得た(平均粒径18

22

8nm、CV値18%)。また、5℃で3週間保存した後の平均粒径は191nm(CV値20%)であり、安定性に優れていた。

【化20】



【0062】実施例2

西洋わさびペルオキシダーゼに3-(2-ピリジルチオ)プロピオン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルを反応させ、さらにメルカプトエタノールによりジチオピリジル基を還元させて、チオール基を導入した西洋わさびペルオキシダーゼ(以下、チオール化HRPと略す)を得た。次に、実施例1-1で得られた反応性リボソームの懸濁液500 $\mu$ lに、チオール化HRPを1mg溶解させた0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)1mlを加え、4℃で24時間攪拌し、HRPをリボソームの外表面に固定化した。反応終了後、Sephadex G-50を用いてゲル濾過し、含リボソーム画分を分取した。これに、HRPの基質である1,2-フェニレンジアミン溶液(10mmol/l)0.1mlを加え、30℃で10分間インキュベートし、さらに0.1N硫酸10 $\mu$ lを加えたところ、褐色の呈色が見られた。この結果から、実施例1-1の反応性リボソームは、チオール化HRPと攪拌するだけで容易にHRPを固定化できることが確認できた。

【0063】比較例1

卵黄ホスファチジルコリン20mg(26 $\mu$ mol)、コレステロール3.9mg(10 $\mu$ mol)およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン2.8mg(4 $\mu$ mol)のみを用いて、実施例1-1と同様の操作により、固形分量約0.25%の大きな一枚膜リボソームを得た。このリボソームに実施例2と同様にしてチオール化HRPを接触させ、ゲル濾過により精製した。次に1,2-フェニレンジアミン溶液(10mmol/l)0.1mlを加え、30℃で10分間インキュベートし、さらに0.1N硫酸10 $\mu$ lを加えたが、発色は見られなかった。この結果から、マレイミド基を持たないリボソームではチオール化HRPを固定できないことがわかる。